

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  <b>C07K 14/78, A61K 38/39, C12N 15/12,          C07K 16/18, G01N 33/68</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/17240</b></p> <p>(43) Internationales          Veröffentlichungsdatum: 30. März 2000 (30.03.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06963</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1999          (21.09.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:          198 42 992.4      21. September 1998 (21.09.98)    DE          199 15 267.5      3. April 1999 (03.04.99)                    DE          199 26 040.0      8. Juni 1999 (08.06.99)                    DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser          US): HAEMOPEP PHARMA GMBH [DE/DE];          Feodor-Lynen-Strasse 5, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÄNDKER, Ludger          [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25, D-30625 Han-          nover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE];          Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Patentanwälte von          Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln          (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,          CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,          NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen          Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen          eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: HMW ENDOSTATIN FOR INHIBITING THE GROWTH OF TUMOURS AND CAPILLARY PROLIFERATION AND FOR          DIAGNOSING VASCULAR AND TUMOUR DISEASES</p> <p>(54) Bezeichnung: HMW-ENDOSTATIN ZUR HEMMUNG DES WACHSTUMS VON TUMOREN UND VON          GEFÄSSWUCHERUNGEN UND ZUR DIAGNOSE VON GEFÄSS- UND TUMORERKRANKUN-          GEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 20px;">The invention relates to HMW endostatins.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 20px;">Die Erfindung betrifft HMW-Endostatine.</p>		

AL

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**HMW-Endostatin zur Hemmung des Wachstums von Tumoren und von Gefäßwucherungen und zur Diagnose von Gefäß- und Tumorerkrankungen**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide mit angiostatischen Eigenschaften, die als HMW-Endostatin (High Molecular Weight - Endostatin) bezeichnet werden, sowie ein Arzneimittel enthaltend die natürlichen und synthetischen Peptide zu therapeutischen Zwecken bei Tumor- und Gefäßerkrankungen.

Diese Stoffe sind dadurch gekennzeichnet, daß sie insbesondere aus Hämofiltrat oder Hämodialysat, das aus menschlichem Blut abfiltriert wird, gewonnen werden können. Die Peptide werden als HMW-Endostatin bezeichnet und können zum Zwecke der Analyse von Erkrankungen und als Medikament verwendet werden.

Die HMW-Endostatine wurden erstmals aus dem Hämofiltrat Nierenkranker nach Ultrafiltration am Hämodialyseapparat gewonnen und wurden anhand ihrer molekularen Masse und den 30 Aminosäuren des N-Terminus charakterisiert. Zur Darstellung des humanen HMW-Endostatin wurde ein patentiertes Verfahren (Forssmann, 1988; DE 36 33 707 C2), welches die für Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hämofiltrat beschreibt, verfeinert. Aus den mit diesem Verfahren gewonnenen Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa, die bei veno-venöser oder arterio-venöser Shuntverbindung abfiltriert werden, können die HMW-Endostatin enthaltenden Fraktionen durch Massenspektrometrie erkannt werden. Es wurde weiter festgestellt, daß mittels weiterer Verfahren diese Substanzen aufgereinigt werden können, bis schließlich einheitliche Eiweißstoffe isoliert und in ihrer Zusammensetzung und Sequenz aufgeklärt wurden. Die Stoffe sind ein humanes Peptid, welche überraschenderweise die Eigenschaft besitzt, sehr potent das Wachstum von Tumoren und Gefäßen zu hemmen. Überraschenderweise besitzt das Molekül eine extrem hohe Plasmahalbwertszeit, was es für die Therapie als beson-

ders wertvoll erscheinen lässt. Bislang ist schon von der Arbeitsgruppe Folkman (Harvard Medical School, Boston, USA) ein verwandtes Protein der Maus mit der Eigenschaft beschrieben worden, das Wachstum von Tumoren und Gefäßen zu hemmen (O'Reilly et al., Cell 88, 277-285, 1997).

Die erfindungsgemäßen HMW-Endostatine, deren Struktur bisher unbekannt war und deren Bildungsstätte im Körper noch ungeklärt ist, zeigen überraschenderweise eine therapeutische Bedeutung als wichtige zirkulierende Peptid des menschlichen Blutes.

Die HMW-Endostatine sind weiter dadurch gekennzeichnet, daß sie durch chemische Synthese und durch gentechnologische Produktion gewonnen werden können und überraschenderweise für zahlreiche weitere Belange genutzt werden können, unter anderem für die Analyse im menschlichen Blut als Diagnosemerkmal von Erkrankungen des Gefäßwachstums, des Wachstums von Tumoren und von Metastasen.

Die vorliegende Erfindung betrifft also neue Peptide, die HMW-Endostatine, ihre Herstellung, die Peptide enthaltende Arzneimittel, sowie natürliche und pharmakologisch verträgliche Derivate von HMW-Endostatin, insbesondere amidierete, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte HMW-Endostatin-Derivate und Fragmente des Peptides. Durch Massenspektrometrie konnten die Molekulargewichte für die vier HMW-Endostatine mit  $22001 \pm 0,02\%$  (1),  $19904 \pm 0,02\%$  (2),  $20995 \pm 2,5$  (3) und  $21843 \pm 0,02\%$  (4) Dalton bestimmt werden.

Natürlich vorkommende Peptiden können insbesondere glykosyliert sein.

Das Peptid HMW-Endostatin (1) hat die Aminosäure-Sequenz

VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQR  
AVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGS  
EGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTESYCETWRTE  
APSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYTVLCIENSFMTAS

Das Peptid HMW-Endostatin (4) hat die Aminosäuresequenz

VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQR  
AVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGS  
EGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTESYCETWRTE  
APSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYTVLCIENSFMT

Es handelt sich möglicherweise um Fragmente des Kollagen-alpha 1 (XVIII).

Die vollständigen Aminosäuresequenzen wurden aus den eigenen Sequenzanalysen bestimmt bzw. aus der bereits bekannten cDNA-Sequenz für Kollagen-alpha 1 (XVIII) hergeleitet (Oh, S.P. et al., Genomics 19, 494-499, 1994).

Das Peptid HMW-Endostatin (2) hat die Aminosäure-Sequenz

YEKPAHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARAAGLLSTYRAFLSSHLQDLSTI  
VRKAERYSLPIVNLKGQVLFNNWDSIFSGHGGQFNMHIPIYSFDGRDIMTDP  
SWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAWRTADTA VTGLASPLSTGKILDQKA  
YSCANRLIVLCIENSFMTDARK

Das Peptid HMW-Endostatin (3) hat die Aminosäuresequenz

PHQLPPPNPISSANYEKPAHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARAAGLLST  
YRAFLSSHLQDLSTIVRKAERYSLPIVNLKGQVLFNNWDSIFSGHGGQFNMH  
IPIYSFDGRDIMTDPSWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAWRTADTA VTGL

ASPLSTGKILDQKAYSCANRLIVLCIENSFMTDARK

Es handelt sich vermutlich um Fragmente von Kollagen-alpha 1 (XV).

Diese vollständigen Aminosäuresequenzen wurden aus der Sequenzanalyse bestimmt bzw. aus der bereits bekannten cDNA-Sequenz für Kollagen-alpha 1 (XV) hergeleitet (Muragaki, Y. et al., J. Biol. Chem., 269, 4042-4046, 1994).

HMW-Endostatin (1) und HMW-Endostatin (4) sind vorzugsweise am Rest Nummer 9 (entspricht T<sup>125</sup> gemäß der Nummerierung von Sasaki et al., EMBO J. 17 (1998) 4249-4256). Bei einer stufenweisen Deglycosylierung des natürlichen HMW-Endostatin (1), das einen Gal-GalNac-NANA Rest trägt (MW = 22,001 Da), werden Derivate mit einem Gal-GalNac Rest (MW = 21,710 Dalton) und ein vollständig deglycosyliertes Derivat mit einem Molekulargewicht von 21,345 Dalton erhalten (NANA: N-Acetylneuraminsäure; Gal: Galactose; NAc: N-Acetyl).

Für HMW-Endostatin (4) ergibt sich ausgehend von der gleichen Glycosylierung mit einem Molekulargewicht von 21,843 Dalton ein teilweise deglycosyliertes Derivat mit einer Masse von 21,552 Dalton und ein deglycosyliertes Derivat mit einer Masse von 21,187 Dalton.

Bevorzugte glycosylierte Derivate und Fragmente von HMW-Endostatin (2) und (3) weisen Massen von 20,995, 19,904 und 16,373 Dalton auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter verschiedene Verfahren zur Herstellung der HMW-Endostatine oder ihrer Derivate durch prokaryontische oder eukaryontische Expression, durch Isolierung aus menschlichem Blut über Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise, und schließlich durch die üblichen Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren mittels Kopplung, Deblockierung und chromatographischer Reinigung.

Die Arzneimittelzubereitung enthält HMW-Endostatin oder ein physiologisch verträgliches Salz der HMW-Endostatine. Die Form und Zusammensetzung des Arzneimittels, welches HMW-Endostatin enthält, richtet sich nach der Art der Verabreichung. Das HMW-Endostatin kann parenteral, intranasal, oral und mittels Inhalation verabreicht werden. Vorzugsweise wird HMW-Endostatin zu einem Injektionspräparat, entweder als Lösung oder als Lyophilisat zur Auflösung unmittelbar vor Gebrauch, konfektioniert. Die Arzneimittelzubereitung kann außerdem Hilfsstoffe enthalten die z.B. abfülltechnisch bedingt sind, einen Beitrag zur Löslichkeit, Stabilität oder Sterilität des Arzneimittels leisten oder den Wirkungsgrad der Aufnahme in den Körper erhöhen.

Die zu verabreichende Tagesdosis für HMW-Endostatin hängt von der Indikation und der Anwendung bestimmter Derivate ab. Sie liegt bevorzugt im Bereich von 1 µm bis 1 g pro Dosis.

Das erfindungsgemäße Peptid HMW-Endostatin ist dadurch gekennzeichnet, daß es sich besonders auch für die Langzeit-Therapie bei Tumorerkrankungen oder anderen Erkrankungen, die durch ein unkontrolliertes Gefäßwachstum gekennzeichnet sind, eignet und bei Dauerbehandlung keine Immunreaktion auslöst. Überraschenderweise besitzt das Molekül eine extrem hohe Plasmahalbwertszeit, was es für die Therapie als besonders wertvoll erscheinen läßt. Das erfindungsgemäße Präparat ist insbesondere für die Kombinationstherapie mit Chemo- oder Strahlentherapie oder in Anschluß an Chemo- oder Strahlentherapie bei Krebs geeignet.

Das erfindungsgemäße Präparat ist weiter als Mittel zur Therapie und Diagnose bei Gefäßerkrankungen des Stütz- und Bindegewebes, der Atemwege, des Herzkreislaufsystems und Urogenitalapparates, des Nervensystems und des Auges einzusetzen, da es zur Herstellung von human verträglichen Antikörpern verwandt werden kann, die geeignet sind, Änderungen des Gefäßwachstums in diesen Orga-

nen festzustellen oder zu beeinflussen.

## Beispiele

### *Isolierung und Charakterisierung von zirkulierendem HMW-Endostatin (1) und von zirkulierendem HMW-Endostatin (2) aus humanem Hämofiltrat*

Als Ausgangsmaterial wurde Hämofiltrat verwendet, das in großen Mengen bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten anfällt und alle Plasmabestandteile bis zu einer Molekülgröße von etwa 20.000 Dalton enthält.

#### *I. Gewinnung des Rohpeptidmaterials*

Das Hämofiltrat wurde mittels einer Hämofiltrationsanlage der Firma Sartorius unter Verwendung von Cellulosetriacetat-Filtern mit einer Ausschlußgröße von 20.000 Dalton (Typ SM 40042, Sartorius, Göttingen, BRD) gewonnen. Das Filtrat stammte von niereninsuffizienten Patienten, die sich durch Langzeit-Hämofiltration in einer stabilen Stoffwechsellage befanden, und wurde unmittelbar nach der Gewinnung mittels Ansäuern und Abkühlung auf 4°C gegen proteolytischen Abbau geschützt. In zwölf Extraktionen mit einer Kationenaustauschersäule (TSK SP 650(M), Merck, Darmstadt, DE) wurden insgesamt 10.000 l Hämofiltrat verarbeitet. Die gepoolten Extrakte wurden auf dem obengenannten Säulenmaterial nacheinander durch verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (sogenannte pH-Pool Eluate) eluiert (Schulz-Knappe, P., Schrader, M., Ständker, L., Richter, R., Hess, R., Jürgens, M., & Forssmann, W.G. (1997) A peptide bank generated by large scale preparation of circulating human peptides. J. Chromatogr.A, 776, 125-1329). Anschließend erfolgte eine RP-Fraktionierung der einzelnen pH-Pool Eluate auf einer präparativen RP-Säule (Pharmacia, Fine-line) mit 80% Acetonitril, 10 mM HCl als Elutionspuffer (Gradient 0-60%B in 60 min) wie in der oben bezeichneten Literaturstelle bereits beschrieben.



Die entstehenden salzfreien Rohfraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet.

## II. Präparative RP-Chromatographie

67 mg der Rohfraktion Nr 25 entstammend aus dem pH-Pool-Eluat 7 (Charge 04/1997) wurden mittels präparativer RP-Chromatographie grob nach Hydrophobizität getrennt. Von einer PrepPak Cartridge der Firma Vydac mit den Dimensionen 47 x 300 mm wurden Fraktionen abgesammelt.

Gerät: BioCad HPLC (Perseptive Biosystems, Freiburg, DE)  
Säule: Vydac PrepPak Cartridge 47 x 300 mm  
Material: Vydac, 300 Å, 15 - 20 µm  
Eluent A: Wasser mit 10mM HCl sowie 20% Methanol  
Eluent B: 100% Methanol mit 10mM HCl  
Gradient: 0 - 25% Eluent B 6.25 min  
          25 - 75% Eluent B 51.25 min  
          100% Eluent B 56.25 min  
Flußrate: 40 ml / min  
Fraktionen: 50 ml bzw. 1.2 min  
Absorption: 214 nm und 280 nm

Die Fraktionen 27 + 28 enthielten die erfindungsgemäßen Peptidsubstanzen.

## III. Analytische RP-HPLC

In einem Gradienten auf einer Vydac-Säule (10 x 250 mm Stahlmantel, Material: RP C4, 300 Å, 5 µm) konnte eine weitere Auftrennung der Fraktionen 27 + 28 aus der vorhergehenden Chromatographiestufe erzielt werden. Die Eluenten waren Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure und 80% Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure.

Gerät: Kontron HPLC-Anlage  
Säule: Vydac, Stahlmantel 10 x 250 mm  
Material: Vydac RP-C4, 300 Å, 5 µm  
Eluent A: Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure  
Eluent B: 80% Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure  
Gradient: 0 - 30% Eluent B 7 min  
30 - 65% Eluent B 77 min  
65 - 100% Eluent B 82 min  
Flußrate: 2 ml / min  
Fraktionen: 2 ml bzw. 1 min  
Absorption: 214 und 280 nm

Die Fraktionen 41 enthielt die erfindungsgemäße Peptidsubstanz HMW-Endostatin (2) und HMW-Endostatine (3).

Die Fraktionen 43 enthielt die erfindungsgemäße Peptidsubstanz HMW-Endostatin (1).

#### *IV. Bestimmung der molekularen Masse von zirkulierendem HMW-Endostatin mittels Elektrospray-Massenspektrometrie*

Die Molekularmassen wurden von den nativen, gereinigten HMW-Endostatin Molekülen aus der Präparation im Schritt III gemessen. Für die drei Substanzen wurden drei molekulare Massen mit Hilfe eines Elektrospray-Massenspektrometers (Sciex API III, Perkin-Elmer, Langen, DE) gemessen. Es zeigten sich Peaks von den acht- bis elffach protonierten Molekülen. Die Molekularmassen betrugen  $19904 \pm 0,02\%$  für HMW-Endostatin (2),  $20995 \pm 2,5$  Dalton für HMW-Endostatin (3) sowie  $21999 \pm 4,2$  Dalton für HMW-Endostatin (1). Bei den HMW-Endostatin Molekülen handelt es sich möglicherweise um Sequenzvarianten oder unterschiedlich glykosylierte Formen des humanen Kollagen-alpha 1 (XV) bzw. Kollagen-alpha 1 (XVIII),

da die gemessenen Molekularmassen nicht mit den aus der Aminosäuresequenz des humanen Kollagen-alpha 1 (XV) bzw. des Kollagen-alpha 1 (XVIII) herleitbaren Massen übereinstimmen.

*V. Reinheitsbestimmung mittels Kapillar-Zonen-Elektrophorese*

Die aufgereinigten Peptide wurden direkt zur Messung in der Kapillar-Zonen-Elektrophorese verwendet. Das Elektropherogramm zeigt lediglich einen Peak und keine weiteren Peaks von Nebenbestandteilen. Dieses Ergebnis zeigt, daß in der Endreinigungsstufe hochreine HMW-Endostatin Moleküle vorlagen.

Gerät: P/ACE System 2000, Beckman Instruments GmbH, München, DE

Kapillare: Uncoated Fused Silica, 500 mm x 75 µm ID

Puffer: 100 mM Natriumphosphat pH 2,5  
0,02% Hydroxypropylmethylcellulose

Temperatur: 25°C

Injektion: 20 sec entspricht 120 nl

Laufzeit: 25 Minuten

Strom: 80 mA, konstant

Absorption: 200 nm

*VI. Sequenzanalyse von HMW-Endostatin*

Die aufgereinigten nativen Peptide werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben wurden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. Es ergaben sich für die HMW-Endostatine

HMW-Endostatin (1)

VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNS...

HMW-Endostatin (4)

VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNS...

HMW-Endostatin (2)

YEKPALHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARA...

HMW-Endostatin (3)

PHQLLPPNPPISSANYEKPALHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARA...

*VII. Bestimmung der biologischen Wirksamkeit von HMW-Endostatin*

Alle mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens aus humanem Hämofiltrat isolierten hochreinen HMW-Endostatine wurde zur Bestimmung der biologischen Funktion in Endothelzell-Proliferationsassays eingesetzt. Für diesen Assay wurden bovine Kapillarendothelzellen aus der Nebennierenrinde von frisch geschlachteten Kälbern, wie in der Literatur beschrieben (Folkman, J. et al., 1979), in Kultur genommen.

Die Ausführung des Proliferationsassays wurde, wie in der Literatur beschrieben (O'Reilly, M., et al. Cell 88, 277-285, 1997), durchgeführt. Das isolierte hochreine HMW-Endostatin wurde den bovinen Kapillarendothelzellen zugegeben und hemmte in konzentrationsabhängigerweise die Proliferation dieser Zellen. Eine halbmaximale Hemmung der Proliferation in diesem Assay wurde bei einer Konzentration von 20 ng/ml HMW-Endostatin erreicht, was überraschenderweise auf eine sehr potente anti-angiogene Wirkung hinweist. In Proliferationsassays, die mit nicht-endothelialen Zellen durchgeführt wurden, z.B. NIH 3T3-Zellen und LMTK-Zellen, zeigte HMW-Endostatin keine antiproliferative Wirkung.

### Patentansprüche

1. HMW-Endostatin erhältlich durch
  - Gewinnung von Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten durch Hämofiltration mit Cellulosetriacetatfiltern mit einer Ausschlußgröße von 20.000 Da,
  - Abkühlung des Hämofiltrats auf 4°C nach Ansäuern
  - Chromatographie an einer Kationenaustauschersäule gemäß der Methode in J. Chromatogr. A., 776, 125 - 1329,
  - Fraktionierung an Reverse Phase C4 mit A: 0.1 Vol% TFA, B: 80 Vol% Acetonitril, 0,1 Vol.-% TFA (Gradient 0 bis 30% B in 7 min, 30-65% B in 77 min),
  - Untersuchung der Fraktionen auf Anwesenheit von HMW-Endostatin mittels Massenspektrometrie.
2. HMW-Endostatin nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um  
HMW-Endostatin (1) mit der Aminosäure-Sequenz  
  
VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQ  
QARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFP.SW  
EALFSGSEGPLKPGARIFSFDGKDVL RHPTWPQKSVWHGSDPNGRRLT  
ESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFM  
TAS

und glykosiliertes HMW-Endostatin (1) mit einem Molekulargewicht von 22 kDa

oder HMW-Endostatin (4) mit der Aminosäure-Sequenz

VHLRPARPTSPPAHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQ  
QARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSW  
EALFSGSEGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNRRRLT  
ESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFM  
T

und glykosiliertes HMW-Endostatin (4) mit einem Molekulargewicht von 21,8 kDa.

oder HMW-Endostatin (2) mit der Aminosäure-Sequenz

YEKPALHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARAAGLLSTYRAFLSSHLQD  
LSTIVRKAERYSLPIVNLKGQVLFNNWDSIFS GHGGQFNMHIPIYSFDG  
RDIMTDPSWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAWRTADTA VTGLASPL  
STGKILDQKAYSCANRLIVLCIENSFMTDARK

und glykosiliertes HMW-Endostatin (2) mit dem Molekulargewicht 20 kDa

oder HMW-Endostatin (3) mit der Aminosäure-Sequenz

PHQLPPPNPISSANYEKPALHLAALNMPFSGDIRADFQCFKQARAAGL  
LSTYRAFLSSHLQDLSTIVRKAERYSLPIVNLKGQVLFNNWDSIFS GHG  
GQFNMHIPIYSFDGRDIMTDPSWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAW  
RTADTA VTGLASPLSTGKILDQKAYSCANRLIVLCIENSFMTDARK

und glykosiliertes HMW-Endostatin (3) Formen mit dem Molekulargewicht 21 kDa

oder ein natürliches und pharmakologisch verträgliches Derivat und Variante, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glykosylierte HMW-Endostatin-Derivate handelt.

3. HMW-Endostatin nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß HMW-Endostatin (1) oder HMW-Endostatin (4) am T<sup>9</sup> glykosyliert, bevorzugt durch Gal-GalNAc-NANA oder ein Fragment davon.
4. Verfahren zur Herstellung des HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das HMW-Endostatin durch prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt wird.
5. Verfahren zur Herstellung des HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man es aus menschlichem Blut über Chromatographie-Verfahren isoliert.
6. Verfahren zur Herstellung des HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man das HMW-Endostatin durch Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der ausgegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.
7. Arzneimittel, enthaltend das HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3 neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.

8. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere in Verbindung mit Gefäßwucherungen, Krebs oder Erkrankungen des Herzkreislauf- und Nervensystems.
9. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 7 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Intumescentes und der Sinnesorgane, insbesondere des Auges.
10. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 7 zur Behandlung von Systemerkrankungen bei Mangel von HMW-Endostatin insbesondere durch Anwendung von HMW-Endostatin zur Substitutionstherapie.
11. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 7 zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, teils vergesellschaftet mit Erkrankungen gemäß Ansprüchen 8 bis 10, indem es in geeigneter Form für die Behandlung für die Elektrolytwirkung bei Tumor- und Gefäßerkrankungen benutzt wird.
12. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 7 zur Behandlung von akuten Erkrankungen gemäß Ansprüchen 8 bis 10, indem es in geeigneter Form für die Behandlung in der Intensivpflege dieser Erkrankungen benutzt wird.
13. Antikörper dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder synthetische Teilstücke gerichtet sind.
14. Arzneimittel nach Anspruch 7 in galenischen Applikationsformen, insbesondere der lyophilisierten, mit Mannit aufgenommenen Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 30



Mikrogramm bis 30 Milligramm reines HMW-Endostatin pro Therapie-Einheit.

15. Diagnostikmittel enthaltend spezifische Antikörper gemäß Anspruch 13.
16. Nukleinsäuren kodierend für HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 2.
17. Diagnostisches Verfahren umfassend den Schritt der Bestimmung der Konzentration des HMW-Endostatin nach einem der Ansprüche 1 bis 3 im Blut.
18. Arzneimittel enthaltend Antikörper nach Anspruch 13 zur Behandlung der Überexpression von HMW-Endostatin.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; HaemoPep Pharma GmbH

<120> HMW-Endostatin zur Hemmung des Wachstums von Tumoren  
und von Gefäßwucherungen und zur Diagnose von Gefäß-  
und Tumorerkrankungen

&lt;130&gt; 992082wo Haemo HMW-Endostatin

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 195

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Val His Leu Arg Pro Ala Arg Pro Thr Ser Pro Pro Ala His Ser His  
1 5 10 15

Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu  
20 25 30

Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln  
35 40 45

Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser  
50 55 60

Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala  
65 70 75 80

Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe Pro Ser Trp  
85 90 95

Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg  
100 105 110

Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro Thr Trp Pro  
115 120 125

Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr

135

140

Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly  
 145 150 155 160

Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala  
 165 170 175

Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met  
 180 185 190

Thr Ala Ser  
 195

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 176

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Tyr Glu Lys Pro Ala Leu His Leu Ala Ala Leu Asn Met Pro Phe Ser  
 1 5 10 15

Gly Asp Ile Arg Ala Asp Phe Gln Cys Phe Lys Gln Ala Arg Ala Ala  
 20 25 30

Gly Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Ala Phe Leu Ser Ser His Leu Gln Asp  
 35 40 45

Leu Ser Thr Ile Val Arg Lys Ala Glu Arg Tyr Ser Leu Pro Ile Val  
 50 55 60

Asn Leu Lys Gly Gln Val Leu Phe Asn Asn Trp Asp Ser Ile Phe Ser  
 65 70 75 80

Gly His Gly Gly Gln Phe Asn Met His Ile Pro Ile Tyr Ser Phe Asp  
 85 90 95

Gly Arg Asp Ile Met Thr Asp Pro Ser Trp Pro Gln Lys Val Ile Trp  
 100 105 110

His Gly Ser Ser Pro His Gly Val Arg Leu Val Asp Asn Tyr Cys Glu  
 115 120 125

Ala Trp Arg Thr Ala Asp Thr Ala Val Thr Gly Leu Ala Ser Pro Leu  
 130 135 140

Ser Thr Gly Lys Ile Leu Asp Gln Lys Ala Tyr Ser Cys Ala Asn Arg  
 145 150 155 160

Leu Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Asp Ala Arg Lys  
 165 170 175

<210> 3

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro His Gln Leu Leu Pro Pro Pro Asn Pro Ile Ser Ser Ala Asn Tyr  
 1 5 10 15

Glu Lys Pro Ala Leu His Leu Ala Ala Leu Asn Met Pro Phe Ser Gly  
 20 25 30

Asp Ile Arg Ala Asp Phe Gln Cys Phe Lys Gln Ala Arg Ala Ala Gly  
 35 40 45

Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Ala Phe Leu Ser Ser His Leu Gln Asp Leu  
 50 55 60

Ser Thr Ile Val Arg Lys Ala Glu Arg Tyr Ser Leu Pro Ile Val Asn  
 65 70 75 80

Leu Lys Gly Gln Val Leu Phe Asn Asn Trp Asp Ser Ile Phe Ser Gly  
 85 90 95

His Gly Gly Gln Phe Asn Met His Ile Pro Ile Tyr Ser Phe Asp Gly  
 100 105 110

Arg Asp Ile Met Thr Asp Pro Ser Trp Pro Gln Lys Val Ile Trp His  
 115 120 125

Gly Ser Ser Pro His Gly Val Arg Leu Val Asp Asn Tyr Cys Glu Ala  
 130 135 140

Trp Arg Thr Ala Asp Thr Ala Val Thr Gly Leu Ala Ser Pro Leu Ser  
 145 150 155 160

Thr Gly Lys Ile Leu Asp Gln Lys Ala Tyr Ser Cys Ala Asn Arg Leu  
 165 170 175

Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Asp Ala Arg Lys  
 180 185 190

<210> 4  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Val His Leu Arg Pro Ala Arg Pro Thr Ser Pro Pro Ala His Ser His  
 1 5 10 15

Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu  
 20 25 30

Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln  
 35 40 45

Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser  
 50 55 60

Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala  
 65 70 75 80

Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe Pro Ser Trp  
 85 90 95

Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg  
 100 105 110

Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro Thr Trp Pro  
 115 120 125

Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr  
 130 135 140

Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly  
 145 150 155 160

Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala  
 165 170 175

Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met

WO 00/17240

PCT/EP99/06963

185

190

Thr

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/06963

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/78 A61K38/39 C12N15/12 C07K16/18 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>O'REILLY M S ET AL: "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth"</p> <p>CELL,US,CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, vol. 88, page 277-285 XP002100111</p> <p>ISSN: 0092-8674</p> <p>page 281, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-page 282, right-hand column, last paragraph; figure 2</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	<p>1,2,4,8,</p> <p>10,11</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2000

Date of mailing of the international search report

25/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/06963

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T SASAKI ET AL: "Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin" EMBO JOURNAL, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 17, no. 15, page 4249-4256-4256 XP002109420 ISSN: 0261-4189 page 4253, right-hand column, paragraph 2 -page 4255, left-hand column, paragraph 2; figure 10	1,2,4,8, 10,11
X	WO 97 40073 A (HAEMOPEP PHARMA GMBH ;FORSSMANN WOLF GEORG (DE); SCHRADER MICHAEL) 30 October 1997 (1997-10-30) claims; examples	1-12,14
P,X	WO 99 29856 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ;SUKHATME VIKAS P (US)) 17 June 1999 (1999-06-17) page 3, line 15 -page 4, line 15; claim 2; figure 2; examples	1-12,14



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06963

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims Nos. 8-12 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound or composition.

2. ☒ Claims Nos.: 13, 15-18  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/06963

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims Nos. 13, 15-18

Claims Nos. 13 and 15.18 relate to a disproportionately large number of possible compounds, products and methods of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of Article 6 PCT and/or can be considered disclosed according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible.

For this reason the search was directed at parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. parts relating to the use of compounds, products and methods as cited in the examples, including closely related homogeneous compounds.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter:      nal Application No

PCT/EP 99/06963

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740073      A	30-10-1997	DE 19615710 A	23-10-1997
		AU 2766597 A	12-11-1997
		EP 0896584 A	17-02-1999
WO 9929856      A	17-06-1999	AU 1718099 A	28-06-1999
		AU 1806599 A	28-06-1999
		AU 1808899 A	28-06-1999
		WO 9929878 A	17-06-1999
		WO 9929855 A	17-06-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06963

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/78 A61K38/39 C12N15/12 C07K16/18 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>O'REILLY M S ET AL: "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth"</p> <p>CELL, US, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, Bd. 88, Seite 277-285 XP002100111</p> <p>ISSN: 0092-8674</p> <p>Seite 281, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 282, rechte Spalte, letzter Absatz; Abbildung 2</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1,2,4,8, 10,11</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Januar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/01/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06963

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	T SASAKI ET AL: "Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin" EMBO JOURNAL,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 17, Nr. 15, Seite 4249-4256-4256 XP002109420 ISSN: 0261-4189 Seite 4253, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 4255, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 10 -----	1,2,4,8, 10,11
X	WO 97 40073 A (HAEMOPEP PHARMA GMBH ;FORSSMANN WOLF GEORG (DE); SCHRADER MICHAEL) 30. Oktober 1997 (1997-10-30) Ansprüche; Beispiele -----	1-12,14
P,X	WO 99 29856 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ;SUKHATME VIKAS P (US)) 17. Juni 1999 (1999-06-17) Seite 3, Zeile 15 -Seite 4, Zeile 15; Anspruch 2; Abbildung 2; Beispiele -----	1-12,14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06963

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich   
 **Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 8-12 sich auf Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☒ Ansprüche Nr. 13, 15-18   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 **siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99 06963

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13 15-18

Die geltenden Patentansprüche 13 und 15-18 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, Produkte und Verfahren, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verbindungen, Produkte und Verfahren wie sie in den Ausführungsbeispielen angegeben sind, einschliesslich nahverwandter homogener Verbindungen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06963

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9740073 A	30-10-1997	DE 19615710 A	23-10-1997
		AU 2766597 A	12-11-1997
		EP 0896584 A	17-02-1999
WO 9929856 A	17-06-1999	AU 1718099 A	28-06-1999
		AU 1806599 A	28-06-1999
		AU 1808899 A	28-06-1999
		WO 9929878 A	17-06-1999
		WO 9929855 A	17-06-1999